

jc978 U.S. PRO  
10/077745  
02/20/02

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takayuki KODA, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: ORGANIC NITROGEN-CONTAINING COMPOSITION AND FERTILIZER COMPRISING THE SAME

## REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number . filed . is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.

Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number . filed . is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**.

Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2001-044137	February 20, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

are submitted herewith

will be submitted prior to payment of the Final Fee

were filed in prior application Serial No. filed

were submitted to the International Bureau in PCT Application Number  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

(A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and

(B) Application Serial No.(s)  
 are submitted herewith  
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.
  
 Norman F. Oblon  
 Registration No. 24,618
C. Irvin McClelland  
Registration Number 21,124

22850

Tel (703) 413-3000  
Fax (703) 413-2220  
(OSMMN 10 98)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

10/07/745  
JC978 U.S. PRO  
02/20/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 2月20日

出願番号

Application Number:

特願2001-044137

出願人

Applicant(s):

味の素株式会社

2001年 7月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2001-3066376

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P-8352  
【提出日】 平成13年 2月20日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C05F 5/00  
【発明の名称】 有機態窒素含有組成物及びそれを含む肥料  
【請求項の数】 7  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵技術研究所内  
【氏名】 香田 隆之  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵技術研究所内  
【氏名】 佐藤 和博  
【特許出願人】  
【識別番号】 000000066  
【氏名又は名称】 味の素株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100089244  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 遠山 勉  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100090516  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 松倉 秀実  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100100549  
【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 有機態窒素含有組成物及びそれを含む肥料

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物を、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させ、次いで、該培地からL-グルタミン酸を分離して得られる発酵母液から成る有機態窒素含有組成物。

【請求項2】 微生物がエンテロバクター属に属する請求項1記載の有機態窒素含有組成物。

【請求項3】 微生物がエンテロバクター・アグロメランスである請求項2記載の有機態窒素含有組成物。

【請求項4】 微生物が、特定のpHにおいて飽和濃度のL-グルタミン酸及び炭素源を含む液体培地で同炭素源を代謝することができ、かつ、前記pHの液体培地中にL-グルタミン酸の飽和濃度を超える量のL-グルタミン酸を蓄積する能力を有する微生物である請求項1～3のいずれか1項に記載の有機態窒素含有組成物。

【請求項5】 前記特定のpHが5.0又はそれ以下である請求項4に記載の有機態窒素含有組成物。

【請求項6】 L-グルタミン酸の生産に適したpHが、L-グルタミン酸が培地中に析出するpHであり、このpHでの培養により培地中にL-グルタミン酸が析出しながら生成蓄積する請求項4又は5に記載のアミノ酸窒素含有組成物。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項に記載の有機態窒素含有組成物を含む肥料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肥料の原料として用いることのできるL-グルタミン酸発酵後の廃液及びそれを含む肥料に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

L-グルタミン酸は、主としてブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型L-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、195~215頁、1986年）。その他の菌株を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物を用いる方法（米国特許第3, 220, 929号）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物を用いる方法（米国特許第3, 563, 857号）、バチルス属、シュードモナス属、セラチア属、アエロバクター・アエロゲネス（現エンテロバクター・アエロゲネス）等の微生物を用いる方法（特公昭32-9393号）、エシェリヒア・コリの変異株を用いる方法（特開平5-244970号）等が知られている。また、本発明者らは、クレブシエラ属、エルビニア属又はパントテア属に属する微生物を用いたL-グルタミン酸の製造法を提案している（特開2000-106869号）。

## 【0003】

また、組換えDNA技術によりL-グルタミン酸の生合成酵素の活性を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属細菌において、エシェリヒア・コリ又はコリネバクテリウム・グルタミクム由来のクエン酸シンターゼをコードする遺伝子の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に効果的であったことが報告されている（特公平7-121228号）。また、特開昭61-268185号公報には、コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有した細胞が開示されている。さらに、特開昭63-214189号公報には、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ遺伝子、及びクエン酸シンターゼ遺伝子を増幅することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる技術が開示されている。

## 【0004】

上記のようなL-グルタミン酸の製造法において、L-グルタミン酸を回収した後の発酵母液は、肥料等の原料として用いられている（特開昭50-129363、特公昭35-16965、特開昭52-7872）。従って、発酵法によるL-グルタミン酸の製造法においては、L-グルタミン酸の生産性が向上することだけでなく、肥料の原料として一層適した発酵母液を生じることが望ましいと考えられる。

## 【0005】

一方、培養液中に蓄積するL-アミノ酸を晶析せしめながら発酵を行う方法が知られている（特開昭62-288号）。この方法は、培養液中に蓄積するL-アミノ酸を析出させることにより、培養液中のL-アミノ酸の濃度を一定量以下に維持するというものである。具体的には、L-トリプトファン、L-チロシン又はL-ロイシンは、培養の温度及びpHの調整、又は界面活性剤の培地への添加によって、発酵中に析出する。

## 【0006】

上記のように、L-アミノ酸を析出せしめながら発酵を行う方法が知られているが、同方法に好適なアミノ酸は、比較的水溶性の低いアミノ酸であって、L-グルタミン酸のように水溶性の高いアミノ酸に適用した例は知られていない。また、L-グルタミン酸を析出させるためには培地を低pHにする必要があるが、前記のようなL-グルタミン酸生産菌は酸性条件下では生育できず、L-グルタミン酸発酵は中性で行われており（米国特許第3,220,929号、第3,032,474号、K. C. Chao & J.W. Foster, J. Bacteriol., 77, 715-725 (1959)）、析出を伴うL-グルタミン酸の発酵生産は知られていない。さらに、ほとんどの好酸菌の生育が酢酸、乳酸、コハク酸等の有機酸により阻害されることが知られている（大島泰郎監修「極限環境微生物ハンドブック」第231頁、SCIENCE FORUM; R.M. Borichewski, J. Bacteriol., 93, 597-599 1967)等）。したがって、同じく有機酸であるL-グルタミン酸に対して多くの微生物が酸性条件下で感受性であると考えられ、酸性条件下でL-グルタミン酸生産能を有する微生物の検索自体、試みられたという報告はない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような現状に対し、L-グルタミン酸の生産性を低下させることなく、肥料等の原料として用いるのに一層適した発酵母液を提供することを課題とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物を、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることにより得られる発酵母液が有機態窒素の含量が高く、肥料等の原料として適していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明は、以下のものを提供する。

(1) L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物を、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させ、次いで、該培地からL-グルタミン酸を分離して得られる発酵母液から成る有機態窒素含有組成物。

(2) 微生物がエンテロバクター属に属する(1)記載の有機態窒素含有組成物。

(3) 微生物がエンテロバクター・アグロメランスである(2)記載の有機態窒素含有組成物。

(4) 微生物が、特定のpHにおいて飽和濃度のL-グルタミン酸及び炭素源を含む液体培地で同炭素源を代謝することができ、かつ、前記pHの液体培地中にL-グルタミン酸の飽和濃度を超える量のL-グルタミン酸を蓄積する能力を有する微生物である(1)～(3)のいずれかに記載の有機態窒素含有組成物。

(5) 前記特定のpHが5.0又はそれ以下である(4)に記載の有機態窒素含有組成物。

(6) L-グルタミン酸の生産に適したpHが、L-グルタミン酸が培地中に

析出する pH であり、この pH での培養により培地中に L-グルタミン酸が析出しながら生成蓄積する (4) 又は (5) に記載のアミノ酸窒素含有組成物。

(7) (1) ~ (6) のいずれかに記載の有機態窒素含有組成物を含む肥料。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

有機態窒素とは、全窒素の内、アンモニア態窒素以外の窒素を指す。一般には、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸等を構成する有機物中の窒素である。

【0012】

本発明の有機態窒素含有組成物は、L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物を、pH が L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培地中に L-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させ、次いで、該培地から L-グルタミン酸を分離することにより得られる発酵母液として得ることができる。

【0013】

本発明で使用する L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物としては、エンテロバクター属に属する微生物が挙げられる。好ましいものは、エンテロバクター・アグロメランスである。

【0014】

また、本発明で使用する L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物としては、特定の pH において飽和濃度の L-グルタミン酸及び炭素源を含む液体培地で同炭素源を代謝することができ、かつ、前記 pH の液体培地中に L-グルタミン酸の飽和濃度を超える量の L-グルタミン酸を蓄積する能力を有する微生物（以下、「L-グルタミン酸蓄積微生物」ともいう）であることが好ましい。前記特定の pH は、培地中に L-グルタミン酸が析出する pH であることが好ましく、このような pH は通常には 5.0 又はそれ以下である。

【0015】

「飽和濃度」とは、液体培地が L-グルタミン酸で飽和しているときの液体培

地に溶解しているL-グルタミン酸の濃度をいう。

【0016】

L-グルタミン酸蓄積微生物を使用する場合には、L-グルタミン酸の生産に適したpHが、L-グルタミン酸が培地中に析出するpHであることが好ましい。このpHでの培養により培地中にL-グルタミン酸が析出しながら生成蓄積する。

【0017】

L-グルタミン酸蓄積微生物は、以下のようにして取得することができる。微生物を含む試料を、特定のpHにおいて飽和濃度のL-グルタミン酸及び炭素源を含む液体培地に接種し、炭素源を代謝する菌株を選抜する。特定のpHとは、特に制限されないが、通常、約5.0以下、好ましくは約4.5以下、さらに好ましくは約4.3以下である。L-グルタミン酸蓄積微生物はL-グルタミン酸を析出させながら発酵生産するのに用いられるものであるが、前記pHが高すぎると、析出させるのに十分なL-グルタミン酸を微生物に生産させることが困難になる。したがってpHは前記の範囲が好ましい。

【0018】

L-グルタミン酸を含む水溶液のpHを低下させると、L-グルタミン酸はγ-カルボキシル基のpKa (4.25, 25°C) 付近で溶解度は著しく減少し、等電点 (pH 3.2) で溶解度は最も低くなり、飽和濃度を越えるL-グルタミン酸は析出する。培地組成によっても異なるが、通常には、L-グルタミン酸は約30°Cにおいては、pH 3.2では10~20g/L, pH 4.0では30~40g/L, pH 4.7では50~60g/L溶解する。尚、pHが一定の値を下回るとL-グルタミン酸を析出させる効果は頭打ちになるので、通常3.0以下にする必要はない。しかし、pHが3.0以下であっても差し支えない。

【0019】

「炭素源を代謝できる」とは、増殖できるか、あるいは増殖しなくても炭素源を消費することができることをいい、すなわち、糖類、有機酸類等の炭素源を異化することをいう。具体的には、例えば、飽和濃度のL-グルタミン酸を含むpH 5.0~4.0、好ましくはpH 4.5~4.0、さらに好ましくはpH 4.

3～4.0、特に好ましくはpH4.0の液体培地中で、適当な温度、例えば28℃、37℃又は50℃にて、2～4日間培養したときに増殖する微生物は、同培地中で炭素源を代謝できる微生物である。さらに、例えば、飽和濃度のL-グルタミン酸を含むpH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0の液体合成培地中で、適当な温度、例えば28℃、37℃又は50℃にて、2～4日間培養したときに増殖せずとも、培地中の炭素源を消費する微生物は、同培地中で炭素源を代謝できる微生物である。

炭素源を代謝できる微生物は、上記液体培地で生育できる微生物を包含する。

#### 【0020】

「生育できる」とは、増殖できるか、あるいは増殖しなくてもL-グルタミン酸を生産することができるということをいう。具体的には、例えば、飽和濃度のL-グルタミン酸を含むpH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0の液体培地中で、適当な温度、例えば28℃、37℃又は50℃にて、2～4日間培養したときに増殖する微生物は、同培地中で生育できる微生物である。さらに、例えば、飽和濃度のL-グルタミン酸を含むpH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0の液体合成培地中で、適当な温度、例えば28℃、37℃又は50℃にて、2～4日間培養したときに増殖せずとも、培地中のL-グルタミン酸の量を増加させる微生物は、同培地中で生育できる微生物である。

#### 【0021】

上記の選抜は、同じ条件で、又はpHもしくはL-グルタミン酸の濃度を変えて2回又は3回以上繰り返してもよい。また、初期の選抜は、飽和濃度より低い濃度のL-グルタミン酸を含む培地で行い、後の選抜を飽和濃度のL-グルタミン酸を含む培地で行ってもよい。さらに、増殖速度に優れる菌株等、好ましい特性を有する菌株を選抜する操作を行ってもよい。

#### 【0022】

L-グルタミン酸蓄積微生物は、上記性質に加えて、液体培地中にL-グルタ

ミン酸の飽和濃度を越える量のL-グルタミン酸を蓄積する能力を有する微生物である。前記液体培地のpHは、前記の性質を有する微生物のスクリーニングに用いた培地のpHと同じか、又はそれに近いpHであることが好ましい。通常、微生物はpHが低くなると高濃度のL-グルタミン酸に対して感受性となるため、L-グルタミン酸に対する耐性という観点からはpHは低くない方が好ましいが、L-グルタミン酸を析出させながら生産させるという観点からは、pHは低い方が好ましい。これらの条件を満足するpH条件としては、3~5、好ましくは4~5、より好ましくは4.0~4.7、さらに好ましくは4.0~4.5、特に好ましくは4.0~4.3が挙げられる。

## 【0023】

L-グルタミン酸蓄積微生物又はその育種の材料としては、例えば、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、パントテア (*Pantoea*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アリサイクロバチルス (*Alicyclobacillus*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属等に属する微生物が挙げられる。これらの中ではエンテロバクター属に属する微生物が好ましい。以下、L-グルタミン酸蓄積微生物について、エンテロバクター属に属する微生物を中心に説明するが、エンテロバクター属に限られず他の属に属する微生物も同様に使用できる。

## 【0024】

エンテロバクター属に属する微生物として具体的には、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*) が、好ましくはエンテロバクター・アグロメランスAJ13355株が挙げられる。同株は、静岡県磐田市の土壤から、低pHでL-グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として分離された株である。

## 【0025】

AJ13355の生理的性質を記す。

- (1) グラム染色性：陰性
- (2) 酸素に対する挙動：通性嫌気性

- (3) カタラーゼ：ポジティブ
- (4) オキシダーゼ：ネガティブ
- (5) 硝酸還元能：ネガティブ
- (6) フォゲスープロスカウエル試験：ポジティブ
- (7) メチルレッド試験：ネガティブ
- (8) ウレアーゼ：ネガティブ
- (9) インドール生成：ポジティブ
- (10) 運動性：有り
- (11) T S I 培地での硫化水素生成：微弱な活性あり
- (12)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ：ポジティブ
- (13) 糖資化性：
  - アラビノース：ポジティブ
  - シュークロース：ポジティブ
  - ラクトース：ポジティブ
  - キシロース：ポジティブ
  - ソルビトール：ポジティブ
  - イノシトール：ポジティブ
  - トレハロース：ポジティブ
  - マルトース：ポジティブ
  - グルコース：ポジティブ
  - アドニトール：ネガティブ
  - ラフィノース：ポジティブ
  - サリシン：ネガティブ
  - メリビオース：ポジティブ
- (14) グリセロール資化性：ポジティブ
- (15) 有機酸資化性：
  - クエン酸：ポジティブ
  - 酒石酸：ネガティブ
  - グルコン酸：ポジティブ

酢酸：ポジティブ

マロン酸：ネガティブ

(16) アルギニンデヒドラターゼ：ネガティブ

(17) オルチンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(18) リジンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(19) フェニルアラニンデアミナーゼ：ネガティブ

(20) 色素形成 黄色

(21) ゼラチン液化能：ポジティブ

(22) 生育 pH pH 4.0 生育可、pH 4.5~7 生育良好

(23) 生育温度 25°C 生育良好、30°C 生育良好、37°C 生育良好、42°C 生育可、45°C 生育不可

#### 【0026】

これらの菌学的性質からAJ13355はエンテロバクター・アグロメラヌスと判定された。

#### 【0027】

エンテロバクター・アグロメラヌスAJ13355は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所）に、受託番号FERM P-16644として寄託され、平成11年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614が付与されている。

#### 【0028】

L-グルタミン酸蓄積微生物は、元来L-グルタミン酸生産能を有していてもよいし、変異処理又は組換えDNA技術等による育種によってL-グルタミン酸生産能を付与、又は増強したものであってもよい。

#### 【0029】

L-グルタミン酸生産能は、例えば、L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素の活性を高めることによって、付与又は増強することができる。また、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることによっても、L-グ

ルタミン酸生産能を増強することができる。

【0030】

L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「G D H」ともいう）、グルタミンシンセターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ（以下、「C S」ともいう）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、「P E P C」ともいう）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ等が挙げられる。これらの酵素の中では、C S、P E P CおよびG D Hのいずれか1種または2種もしくは3種が好ましい。さらに、L-グルタミン酸蓄積微生物においては、C S、P E P CおよびG D Hの3種の酵素の活性がともに高められていることが好ましい。特に、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムのC Sは、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、L-グルタミン酸及びN A D Hによる阻害を受けないため、好ましいものである。

【0031】

C S、P E P CまたはG D H活性を高めるには、例えば、C S、P E P CまたはG D Hをコードする遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて宿主微生物を形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のC S、P E P C及びG D Hをコードする遺伝子（以下、おのののをこの順に「g l t A遺伝子」、「p p c遺伝子」、「g d h A遺伝子」と略する）のコピー数が上昇し、その結果C S、P E P C及びG D H活性が高められる。

【0032】

クローニングされたg l t A遺伝子、p p c遺伝子、およびg d h A遺伝子は、単独または任意の2種または3種の組合せで、上記出発親株に導入される。2種または3種の遺伝子を導入する場合には、一種類のプラスミド上に2種又は3種の遺伝子がクローン化されて宿主に導入されるか、あるいは共存可能な2種類または3種類のプラスミド上に別々にクローン化されて宿主に導入される。

## 【0033】

尚、同種の酵素をコードする遺伝子であって、由来が異なる2又は3以上の遺伝子を同一の宿主に導入してもよい。

## 【0034】

上記プラスミドとしては、例えばエンテロバクター属等に属する微生物の細胞中で自律複製可能なプラスミドであれば特に制限されないが、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pACYC177、pACYC184等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

## 【0035】

形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979))、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))、あるいはエレクトロポレーション法 (Miller J.H., "A Short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1992) 等により行うことができる。

## 【0036】

CS、PEPCまたはGDH活性を高めることは、gltA遺伝子、ppc遺伝子またはgdhA遺伝子を、宿主となる上記出発親株の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。エンテロバクター属等に属する微生物の染色体DNA上にgltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子を多コピーで導入するには、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピート等、染色体DNA上に多コピー存在する配列が利用できる。あるいは、gltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子をトランスポゾンに搭載して、これを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。形質転換株の細胞内のgltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子のコピー数が上昇し、その結果CS、PEPCまたはGDH活性が高められる。

## 【0037】

コピー数を上昇させるgltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子

の供給源となる生物としては、CS、PEPC及びGDH活性を有する生物ならいかなる生物でも良い。なかでも原核生物である細菌、たとえばエンテロバクター属、クレブシェラ属、エルビニア属、パントエア属、セラチア属、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、バチルス属に属する細菌が好ましい。具体的な例としては、エシェリヒア・コリ、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等が挙げられる。gltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子は、上記のような微生物の染色体DNAより得ることができる。

## 【0038】

gltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子は、おのおのCS、PEPCもしくはGDH活性を欠失した変異株を用いてその栄養要求性を相補するDNA断片を上記微生物の染色体DNAから単離することによって取得できる。またエシェリヒア属のこれら遺伝子、コリネバクテリウム属細菌のこれら遺伝子は既に塩基配列が明らかにされていることから(Biochemistry、第22巻、5243～5249頁、1983年; J. Biochem.、第95巻、909～916頁、1984年; Gene、第27巻、193～199頁、1984年; Microbiology、第140巻、1817～1828頁、1994年; Mol. Gen. Genet.、第218巻、330～339頁、1989年; Molecular Microbiology、第6巻、317～326頁、1992年)それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、染色体DNAを鑄型にしてPCR法により取得することが可能である。

## 【0039】

CS、PEPCまたはGDH活性を高めるには、上記の遺伝子増幅による以外にも、gltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子の発現が強化されることによって達成される。例えば、gltA遺伝子、ppc遺伝子、またはgdhA遺伝子のプロモーターをそれよりも強力な他のプロモーターに置換することによって発現が強化される。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。プロモーターが置換されたgltA遺伝子、ppc遺伝子またはgdhA遺伝子は、

ラスミド上にクローニングされて宿主微生物に導入されるか、またはレペッティブDNA、インバーティッド・リピート、またはトランスポゾン等を用いて宿主微生物の染色体DNA上に導入される。

## 【0040】

また、CS、PEPCまたはGDH活性を高めるには、染色体上のgltA遺伝子、ppc遺伝子またはgdhA遺伝子のプロモーターを、それらよりも強力なプロモーターで置換する(WO87/03006号、特開昭61-268183号参照)か、またはそれぞれの遺伝子のコード配列の上流に、強力なプロモーターを挿入すること(Gene, 29, (1984) 231-241参照)によっても達成することができる。具体的には、強力なプロモーターに置換されたgltA遺伝子、ppc遺伝子もしくはgdhA遺伝子またはそれらの一部を含むDNAと、染色体上の対応する遺伝子との間で相同組換えを起こさせればよい。

## 【0041】

L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(以下、「 $\alpha$ KGDH」ともいう)、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。これらの酵素の中では、 $\alpha$ KGDHが好ましい。

## 【0042】

エンテロバクター属等に属する微生物において、上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、あるいは遺伝子工学的手法によって、上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。

## 【0043】

変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。遺伝子に変異が導入される部位は、酵素タンパク質をコードするコード領域で

あってもよく、プロモーター等の発現制御領域であってもよい。

【0044】

また、遺伝子工学的手法には、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等を用いる方法がある。例えば、クローン化された目的遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入し、機能を失った遺伝子（欠失型遺伝子）を作製する。次いで、この欠失型遺伝子を宿主微生物の細胞に導入し、相同組み換えを利用して染色体上の目的遺伝子を前記欠失型遺伝子に置換する（遺伝子破壊）。

【0045】

細胞中の目的酵素の活性が低下または欠損していること、および活性の低下の程度は、候補株の菌体抽出液または精製画分の酵素活性を測定し、野生株と比較することによって確認することができる。例えば、 $\alpha$  KGDH活性は、Reedらの方法 (L.J.Reed and B.B.Mukherjee, Methods in Enzymology 1969, 13, p.55-61) に従って測定することができる。

【0046】

また、目的とする酵素によっては、変異株の表現型によって目的変異株を選択することができる。例えば、 $\alpha$  KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株は、好気的培養条件ではグルコースを含む最少培地、あるいは、酢酸やL-グルタミン酸を唯一の炭素源として含む最少培地で増殖できないか、または増殖速度が著しく低下する。ところが、同一条件でもグルコースを含む最少培地にコハク酸またはリジン、メチオニン、及びジアミノピメリン酸を添加することによって通常の生育が可能となる。これらの現象を指標として $\alpha$  KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株の選抜が可能である。

【0047】

相同組換えを利用したブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの $\alpha$  KGDH遺伝子欠損株の作製法は、WO95/34672号に詳述されており、他の微生物にも同様の方法を適用することができる。

【0048】

その他、遺伝子のクローンング、DNAの切断、連結、形質転換法等の技術については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989

)) 等に詳述されている。

【0049】

以上のようにして得られる  $\alpha$  KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株の具体例としては、エンテロバクター・アグロメラنس AJ13356が挙げられる。エンテロバクター・アグロメラنس AJ13356は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所）に、受託番号 FERM P-16645として寄託され、平成11年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 FERM BP-6615が付与されている。エンテロバクター・アグロメラنس AJ13356は、 $\alpha$  KGDH-E1サブユニット遺伝子（sucA）が破壊された結果、 $\alpha$  KGDH活性を欠損している。

【0050】

また、本発明に用いられる微生物の一例であるエンテロバクター・アグロメラنسは、糖を含有する培地で培養を行うと、菌体外に粘液質を生成するために、操作効率がよくないことがある。したがって、このような粘液質を生成する性質を有するエンテロバクター・アグロメラنسを用いる場合には、粘液質の生成量が野生株よりも低下した変異株を用いることが好ましい。変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。また、粘液質の生成量が低下した変異株は、変異処理した菌株を、糖を含む培地、例えば5g/Lのグルコースを含むLB培地プレートに撒き、プレートを約45°傾けて培養したときに、液質が流れ落ちないようになったコロニーを選抜することによって選択することができる。

【0051】

本発明において、L-グルタミン酸生産能の付与又は増強、及び上記の粘液質低生産変異等の好ましい性質の付与は、任意の順序で行うことができる。

【0052】

本発明の微生物を、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養することにより、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄

積させることができる。

## 【0053】

L-グルタミン酸蓄積微生物を、pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養することにより、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させることができる。また、中性pHにて培養を開始し、培養終了時にL-グルタミン酸が析出する条件となるようにしてもよい。

## 【0054】

ここで「L-グルタミン酸が析出する条件」とは、L-グルタミン酸蓄積微生物がL-グルタミン酸を生成蓄積したときに、その生産されたL-グルタミン酸が析出する条件をいう。例えば、培地のpHが3~5に調整される条件をいう。

## 【0055】

また、微生物の生育に適したpHで培養し、次いでL-グルタミン酸の生産に適したpHで培養してもよい。培地に、L-グルタミン酸の生産に適したpHにおいて微生物が資化できない糖源が含まれていたり、微生物の生育を阻害する有機酸が含まれていたりする場合には、微生物がその糖源を資化できる、または、微生物の生育が有機酸により阻害できないpHで培養して、糖源又は有機酸を微生物に消費させた後に、L-グルタミン酸の生産に適したpHで培養してもよい。

## 【0056】

本発明の好ましい態様においては、培養の際に、培地中のL-グルタミン酸濃度が、自然起晶が起こる濃度よりも低いときに、培地中にL-グルタミン酸の結晶を存在させる操作を行う。

## 【0057】

本明細書において、「自然起晶」とは、L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物がL-グルタミン酸を蓄積することにより、培地中のL-グルタミン酸濃度が飽和濃度を超えて自然に培地中にL-グルタミン酸が析出することをいう。

## 【0058】

培地中にL-グルタミン酸の結晶を存在させる操作とは、人為的に培地中に結

晶を存在させる操作を意味する。このような操作の例としては、培地に結晶を添加すること、培養開始時に或る量のL-グルタミン酸を培地に溶解させておき、培養途中でpHを下げることにより、強制的に析出させること等が挙げられる。

## 【0059】

結晶を培地中に存在させる量は、通常には0.01~10g/Lである。また、存在させる時期は、培地中のL-グルタミン酸の蓄積量が飽和濃度近くまで（例えばpH 4.5においては25g/L以上）上昇した時が好ましい。培地中のL-グルタミン酸の結晶の存在量やL-グルタミン酸の濃度は、当業者に周知の方法で測定することができる。L-グルタミン酸の結晶は、培養液を静置し、デカントにより培養液から採取して存在量を測定する。培地中のL-グルタミン酸の濃度とは、溶解しているL-グルタミン酸の濃度である。培地中に結晶が析出している場合は、遠心分離（又は濾過）により固形分を分離し、得られた清澄液のL-グルタミン酸濃度の測定値を指す。

## 【0060】

培地中にL-グルタミン酸の結晶を存在させる操作は、好ましくは、L-グルタミン酸の結晶を添加することである。

## 【0061】

L-グルタミン酸の結晶には $\alpha$ 型と $\beta$ 型の結晶が存在する (H. Takahashi, T. Takenishi, N. Nagashima, Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 923 (1962); J. D. Bernal, Z. Krist., 78, 363 (1931); S. Hirokawa, Acta Cryst., 8, 637 (1955))。 $\alpha$ 型の結晶を得る場合には、添加する結晶は $\alpha$ 型であることが好ましい。

## 【0062】

好ましい結晶の添加量は、結晶の結晶型等の条件で変わるが、 $\alpha$ 型の結晶である場合には、通常には0.2g/L以上である。この濃度以上であると、再現性良く $\alpha$ 型の結晶を得ることができる。 $\alpha$ 型の結晶は、その形状の点から、 $\beta$ 型の結晶に比べて取り扱いが容易である。

## 【0063】

培養に用いられる培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を用いる

ことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は、培養する菌株の利用可能なものならばよい。

## 【0064】

炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、でんぶん加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸等も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

## 【0065】

窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

## 【0066】

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらにこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白分解物等が使用され、代謝又は生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添する事が必要である。

## 【0067】

無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

## 【0068】

培養は、通常には、発酵温度が20～42℃、pHが3～5、好ましくは4～5、より好ましくは4～4.7、特に好ましくは4～4.5の条件で通気培養により行う。通常には10時間ないし4日間程度培養することにより培養液中に著量のL-グルタミン酸が蓄積される。蓄積されたL-グルタミン酸のうち、飽和濃度を超えるものは、培地中に析出する。

## 【0069】

培養終了後、培養液中に析出したL-グルタミン酸は、遠心分離又は濾過等により分離することができる。また、培地中に溶解しているL-グルタミン酸は、公知の方法に従って分離することができる。例えば、濃縮晶析する方法、あるいは

はイオン交換クロマトグラフィー等によって単離することができる。培養液中に析出したL-グルタミン酸は、培地中に溶解しているL-グルタミン酸を晶析した後に、併せて分離してもよい。

## 【0070】

L-グルタミン酸の分離により得られる発酵母液は、有機態窒素含有組成物として用いることができる。

## 【0071】

本発明の有機態窒素組成物は、全窒素に対する有機態窒素の含量が高い。好ましくは、全窒素に対する有機態窒素の質量%が35%以上である。

## 【0072】

また、本発明によれば、低pHでL-グルタミン酸が製造されるため、培地のpHを調整するためのアンモニアの使用量が少なくて済み、それに応じてL-グルタミン酸の晶析に用いる酸の量が少なくて済むので、発酵母液中のアニオンの量が少ない。一般的にはここで用いる酸とは塩酸や硫酸などの無機酸であり、例えばL-グルタミン酸の晶析に硫酸を用いた場合は、発酵母液中の硫酸根が少ない。好ましくは、有機態窒素に対する硫酸根の質量%が500%以下である。硫酸根の様なアニオンの含量は、肥料としては低い方が好ましいので、本発明の有機態窒素含有組成物は、肥料の原料に適したものである。

## 【0073】

本発明の有機態窒素含有組成物は、液体のままでも、中和し乾燥して中性の顆粒状乾燥物にしてもよい（特開昭52-7872参照）。

## 【0074】

本発明の有機態窒素含有組成物を含む肥料の製造は、従来の発酵母液を原料とする肥料の製造と同様にして行うことができる。肥料の製造の際に、他の肥料成分を添加してもよい。本発明の肥料は、本発明の有機態窒素含有組成物を原料とするため、有機態窒素（特にL-グルタミン酸の窒素の他の有機態窒素）の含量が高く、硫酸根等のアニオンの含量の低いものとなり得る。

## 【0075】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。実施例において、特記しない限りアミノ酸はL型である。

## 【0076】

## 【参考例1】

## &lt;1&gt;酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物の探索

酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物の探索は、以下のようにして行った。1gの土壤、果実、植物体、河川水などの自然界より得られたサンプルおよそ500点を、それぞれ5mLの滅菌水に懸だくし、そのうち200μLを塩酸にてpHを4.0に調製した固体培地20mLに塗布した。同培地の組成は、以下のとおりである。グルコース3g/L、硫酸アンモニウム1g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.2g/L、リン酸二水素カリウム0.5g/L、塩化ナトリウム0.2g/L、塩化カルシウム二水塩0.1g/L、硫酸第一鉄七水塩0.01g/L、硫酸マンガン四水塩0.01g/L、硫酸亜鉛二水塩0.72mg/L、硫酸銅五水塩0.64mg/L、塩化コバルト六水塩0.72mg/L、ホウ酸0.4mg/L、モリブデン酸ナトリウム二水塩1.2mg/L、ビオチン50μg/L、パントテン酸カルシウム50μg/L、葉酸50μg/L、イノシトール50μg/L、ナイアシン50μg/L、パラアミノ安息香酸50μg/L、ピリドキシン塩酸塩50μg/L、リボフラビン50μg/L、チアミン塩酸塩50μg/L、シクロヘキシミド50mg/L、寒天20g/L。

## 【0077】

上記のサンプルを塗布した培地を、28°C、37°C又は50°Cにて、2~4日間培養し、コロニーを形成する菌株を378株取得した。

## 【0078】

続いて、上記のようにして得られた菌株を、飽和濃度のL-グルタミン酸を含む液体培地（塩酸にてpH4.0に調整）3mLを注入した長さ16.5cm、径14mmの試験管に植菌し、24時間~3日間、28°C、37°C又は50°Cにて振とう培養を行い、増殖する菌株を選抜した。前記培地の組成は、以下のとおりである。グルコース40g/L、硫酸アンモニウム20g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.5g/L、リン酸二水素カリウム2g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、塩化カルシウム二水塩0.25g/L、硫酸第一鉄七水塩0.02g/L、硫酸マンガン四水塩0.02g/L、硫酸亜鉛二水塩0.72mg/L、硫酸銅五水塩0.64mg/L、塩化コバルト六水塩0.72mg/L、ホウ酸0.4mg/L、モリブデン酸

ナトリウム二水塩1.2mg/L、酵母エキス2g/L。

【0079】

このようにして、酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物78株を取得することに成功した。

【0080】

＜2＞酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する微生物からの増殖速度に優れた菌株の選抜

上記のようにして得られた、酸性環境下にてL-グルタミン酸耐性を有する種々の微生物を、M9培地 (J. Sambrook, E.F. Fritsh, T. Maniatis "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989) に20g/Lのグルタミン酸と2g/Lのグルコースを加え、pHを塩酸で4.0に調整した培地3mLを注入した長さ16.5cm、径14mmの試験管に植菌し、培地の濁度を経時的に測定することによって、増殖速度の良好な菌株の選抜を行った。その結果、生育が良好な菌株として、静岡県磐田市の土壌より採取されたAJ13355株が得られた。本菌株は、前記の菌学的性質から、エンテロバクター・アグロメランスと判定された。

【0081】

＜3＞エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株からの粘液質低生産株の取得

エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株は糖を含有する培地で培養を行うと、菌体外に粘液質を生成するために、操作効率がよくない。そこで、粘液質低生産株の取得を、紫外線照射法 (Miller, J.H. et al., "A Short Course in Bacterial Genetics; Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., p.150, 1992) により行った。

【0082】

60Wの紫外線ランプから60cm離した位置で、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株に紫外線を2分間照射した後、LB培地で終夜培養して変異を固定した。変異処理した菌株を、5g/Lのグルコースと20g/Lの寒天を含むLB培地に、プレート当たり約100個程度のコロニーが出現するように希釀して撒き、プレートを約45°傾けて30°Cで終夜培養を行い、粘液質が流れ

落ちないようになったコロニーを20個選抜した。

## 【0083】

選抜された株の中から、5g/Lのグルコースと20g/Lの寒天を含むLB培地で5回継代培養を行っても復帰変異株が出現せず、さらに、LB培地及び5g/Lのグルコースを含むLB培地ならびにM9培地 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press, U.S.A. (1989)) に20g/LのL-グルタミン酸と2g/Lのグルコースを加え、pHを塩酸で4.5に調製した培地で親株と同等の生育を示すという条件を満たす菌株として、SC17株を選抜した。

## 【0084】

<4>エンテロバクター・アグロメランスSC17株からのグルタミン酸生産菌の構築

(1) エンテロバクター・アグロメランスSC17株からのαKGDH欠損株の作製

エンテロバクター・アグロメランスSC17株から、αKGDHを欠損し、さらにL-グルタミン酸生合成系が強化された株を作製した。

## 【0085】

(i) エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株のαKGDH遺伝子(以後「sucAB」という)のクローニング

エンテロバクター・アグロメランス AJ13355株のsucAB遺伝子は、エシェリヒア・コリのαKGDH-E1サブユニット遺伝子(以後「sucA」という)欠損株の酢酸非資化性を相補するDNA断片を、エンテロバクター・アグロメランス AJ13355株染色体DNAより選択することによって、クローニングした。

## 【0086】

エンテロバクター・アグロメランス AJ13355株の染色体DNAは、エシェリヒア・コリにおいて通常染色体DNAを抽出するのに使用されるのと同様の方法(生物工学実験書、日本生物工学会編、97-98頁、培風館、1992年)で単離した。ベクターとして使用したpTWV228(アンピシリン耐性)

は宝酒造社製の市販品を用いた。

## 【0087】

A J 1 3 3 5 5 株の染色体DNAをE c o T 2 2 1で消化したもの、およびp T W V 2 2 8 をP s t Iで消化したものをT 4 リガーゼにより連結し、s u c A 欠損のエシェリヒア・コリ J R G 4 6 5 株 (Her b e r t J. ら M o l . G e n . G e n e t i c s 1 9 6 9, 1 0 5 卷、1 8 2 頁) を形質転換した。こうして得た形質転換株より、酢酸最少培地にて増殖する株を選択し、これよりプラスミドを抽出してp T W V E K 1 0 1 と命名した。p T W V E K 1 0 1 を持つエシェリヒア・コリ J R G 4 6 5 株は酢酸非資化性という形質の他にコハク酸もしくはL-リジンおよびL-メチオニンの要求性も回復していた。このことよりp T W V E K 1 0 1 にはエンテロバクター・アグロメランスのs u c A 遺伝子が含まれていると考えられる。

## 【0088】

p T W V E K 1 0 1 のエンテロバクター・アグロメランス由来DNA断片の制限酵素地図を図1に示した。図1の斜線にて示した部分の塩基配列を決定した結果を配列番号1に示した。この配列の中には、2つの完全長のO R F と、2つのO R F の部分配列と思われる塩基配列が見いだされた。これらのO R F またはその部分配列がコードし得るアミノ酸配列を、5'側から順に配列番号2~5に示す。これらのホモロジー検索をした結果、塩基配列を決定した部分は、サクシネートデヒドロゲナーゼアイロンースルファープロテイン遺伝子 (s d h B) の3'末端側の部分配列、完全長のs u c A と $\alpha$  K G D H - E 2 サブユニット遺伝子 (s u c B) 、サクシニルC o Aシンセターゼ $\beta$ サブユニット遺伝子 (s u c C) の5'末端側の部分配列を含んでいることが明らかとなった。これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列をそれぞれエシェリヒア・コリのもの (Eur. J. Biochem., 141, 351-359 (1984)、Eur. J. Biochem., 141, 361-374 (1984)、Biochemistry, 24, 6245-6252 (1985)) と比較した結果を図2~5に示す。このように各アミノ酸配列は非常に高い相同意を示した。また、エンテロバクター・アグロメランス染色体上でもエシェリヒア・コリと同様に (Eur. J. Biochem., 141, 351-359 (1984)、Eur. J. Biochem., 141, 361-374 (1984)、Biochemistry, 24,

6245-6252 (1985))、s d h B - s u c A - s u c B - s u c C とクラスターを構成していることが判明した。

## 【0089】

(ii) エンテロバクター・アグロメランスSC17株由来の $\alpha$ KGDH欠損株の取得

上記のようにして取得されたエンテロバクター・アグロメランスのs u c A B 遺伝子を用い、相同組換えによりエンテロバクター・アグロメランスの $\alpha$ KGD H欠損株の取得を行った。

## 【0090】

p TWVEK101をS p h Iで切断してs u c Aを含む断片を切り出した後、クレノーフラグメント（宝酒造（株））で平滑末端化した断片を、E c o R I で切断しクレノーフラグメントで平滑末端化したp B R 3 2 2（宝酒造（株））とを、T 4 DNAリガーゼ（宝酒造（株））を用いて結合した。得られたプラスミドを、s u c Aのほぼ中央部分に位置する制限酵素B g 1 I I 認識部位で同酵素を用いて切断し、クレノーフラグメントで平滑末端化し、再びT 4 DNAリガーゼで結合した。以上の操作によって、新たに構築されたプラスミド中のs u c Aにはフレームシフト変異が導入され、同遺伝子は機能しなくなると考えられた。

## 【0091】

上記のようにして構築されたプラスミドを制限酵素A p a L Iで切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、フレームシフト変異が導入されたs u c A及びp B R 3 2 2由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片を回収した。回収したDNA断片を再びT 4 DNAリガーゼで結合し、 $\alpha$ KGDH遺伝子破壊用プラスミドを構築した。

## 【0092】

上記のようにして得られた $\alpha$ KGDH遺伝子破壊用プラスミドを用いて、エンテロバクター・アグロメランスSC17株を、エレクトロポレーション法 (Miller J.H., "A Short Course in Bacterial Genetics; Handbook", Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., p.279, 1992) によって形質転換し、テト

ラサイクリン耐性を指標にプラスミドが相同組換えによって染色体上のsucAが変異型に置換された菌株を取得した。取得された株をSC17sucA株を命名した。

## 【0093】

SC17sucA株が $\alpha$ KGDH活性を欠損していることを確認するために、LB培地で対数増殖期まで培養した同株の菌体を用いて、Reedらの方法 (L.J.Reed and B.B.Mukherjee, Methods in Enzymology 1969, 13, p.55-61) に従って酵素活性を測定した。その結果、SC17株からは0.073 ( $\Delta$  A B S / min / mgタンパク) の $\alpha$ KGDH活性が検出されたのに対し、SC17sucA株では $\alpha$ KGDH活性を検出できず、目的通りsucAが欠損していることが確かめられた。

## 【0094】

(2) エンテロバクター・アグロメランスSC17sucA株のL-グルタミン酸生合成系の強化

続いてSC17sucA株に、エシェリヒア・コリ由来のクエン酸シンターゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子、およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した。

## 【0095】

(i) エシェリヒア・コリ由来のgltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子を有するプラスミドの作製

gltA遺伝子、ppc遺伝子、およびgdhA遺伝子を有するプラスミドの作成の手順を、図6、7に基づいて説明する。

## 【0096】

エシェリヒア・コリ由来のgdhA遺伝子を有するプラスミドpBRGDH (特開平7-203980号) をHindIII、SphI消化し、T4DNAポリメラーゼ処理で両末端を平滑末端にした後、gdhA遺伝子を有するDNA断片を精製回収した。一方、エシェリヒア・コリ由来のgltA遺伝子およびppc遺伝子を有するプラスミドpMWCP (WO97/08294号) をXbaIで消化後、T4DNAポリメラーゼで両末端を平滑末端にした。これに、上で精

製したg d h A遺伝子を有するDNA断片を混合後、T4リガーゼにより連結し、pMWC Pに更にg d h A遺伝子を搭載したプラスミドpMWC PGを得た（図6）。

## 【0097】

同時に、広宿主域プラスミドRSF1010の複製起点を有するプラスミドpVIC40（特開平8-047397号）をNot Iで消化し、T4 DNAポリメラーゼ処理した後、Pst I消化したものと、pBR322をEcoT14 I消化し、T4 DNAポリメラーゼ処理した後、Pst I消化したものとを混合後、T4リガーゼにより連結し、RSF1010の複製起点及びテトラサイクリン耐性遺伝子を有するプラスミドRSF-Tetを得た（図7）。

## 【0098】

次に、pMWC PGをEcoRI、Pst I消化し、g1tA遺伝子、ppc遺伝子、およびg d h A遺伝子を有するDNA断片を精製回収し、RSF-Tetを同様にEcoRI、Pst I消化し、RSF1010の複製起点を有するDNA断片を精製回収したものと混合後、T4リガーゼにより連結し、RSF-Tet上にg1tA遺伝子、ppc遺伝子、およびg d h A遺伝子を搭載したプラスミドRSFC PGを得た（図8）。得られたプラスミドRSFC PGがg1tA遺伝子、ppc遺伝子およびg d h A遺伝子を発現していることは、エシェリヒア・コリのg1tA遺伝子、ppc遺伝子、あるいはg d h A遺伝子欠損株の栄養要求性の相補と各酵素活性の測定によって確認した。

## 【0099】

(ii) ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のg1tA遺伝子を有するプラスミドの作製

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のg1tA遺伝子を有するプラスミドは、以下のようにして構築した。コリネバクテリウム・グルタミカムのg1tA遺伝子の塩基配列（Microbiology, 1994, 140, 1817-1828）をもとに、配列番号6及び7に示す塩基配列を有するプライマーDNAを用い、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAを鑄型としてPCRを行い、約3kbのg1tA遺伝子断片を得た。この断片をSma I

消化したプラスミドpHSG399（宝酒造（株）より購入）に挿入し、プラスミドpHSGCBを得た（図9）。次に、pHSGCBをHindIIIで切斷し切り出された約3kbのgltA遺伝子断片をHindIII消化したプラスミドpSTV29（宝酒造（株）より購入）に挿入し、プラスミドpSTVCBを得た（図9）。得られたプラスミドpSTVCBがgltA遺伝子を発現していることは、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355株中の酵素活性の測定によって確認した。

## 【0100】

## (iii) RSFCPG及びpSTVCBのSC17sucA株への導入

エンテロバクター・アグロメランスSC17sucA株を、RSFCPGを用いてエレクトロポレーション法にて形質転換し、テトラサイクリン耐性を示す形質転換体SC17sucA/RSFCPG株を取得した。さらにSC17sucA/RSFCPG株をpSTVCBを用いてエレクトロポレーション法にて形質転換し、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株を取得した。

## 【0101】

## &lt;4&gt;低pH環境下でL-グルタミン酸に対する耐性が向上した菌株の取得

エンテロバクター・アグロメランスSC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株から、低pH環境下で高濃度のL-グルタミン酸に対する耐性が向上した菌株（以下、「低pH下高濃度Glu耐性株」ともいう）の分離を行った。

## 【0102】

SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株をLBG培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、NaCl 10g/L、グルコース5g/L）にて30℃一夜培養後、生理食塩水にて洗浄した菌体を適宜希釈して、M9-E培地（グルコース4g/L、 $\text{Na}_2\text{HPo}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  17g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L、NaCl 0.5g/L、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g/L、10mM MgSO<sub>4</sub>、10  $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub>、L-リジン 50mg/L、L-メチオニン 50mg/L、DL-ジアミノピメリン酸 50mg/L、テトラサイクリン 25mg/L、クロラムフェニコール 25mg/L、L-グルタミン酸 30g/L、アンモニア水にてpH4.5に調整）プレートに塗布した。32℃、2日間培養後出現したコロニーを低pH下高濃度Glu耐性株として取得した。

## 【0103】

得られた株について、M9-E液体培地での増殖度の測定、及びL-グルタミン酸生産試験培地（グルコース40g/L、硫酸アンモニウム20g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.5g/L、リン酸二水素カリウム2g/L、塩化ナトリウム0.5g/L、塩化カルシウム二水塩0.25g/L、硫酸第一鉄七水塩0.02g/L、硫酸マンガン四水塩0.02g/L、硫酸亜鉛二水塩0.72mg/L、硫酸銅五水塩0.64mg/L、塩化コバルト六水塩0.72mg/L、ホウ酸0.4mg/L、モリブデン酸ナトリウム二水塩1.2mg/L、酵母エキス2g/L、L-リジン塩酸塩200mg/L、L-メチオニン200mg/L、DL- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -ジアミノピメリン酸200mg/L、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L、クロラムフェニコール25mg/L）5mlを注入した50ml容大型試験管におけるL-グルタミン酸生産能の検定を実施し、増殖度が最もよく、L-グルタミン酸生産能が親株SC17/RSFCPG+pSTVCB株と変わらなかった株は、エンテロバクター・アグロメラヌスAJ13601と命名された。AJ13601株は、1999年8月18日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所）（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。

## 【0104】

## 【実施例1】

エンテロバクター・アグロメラヌスAJ13601株を、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L及びクロラムフェニコール25mg/Lを含有するLBG寒天培地（トリプトン 10g/L、酵母エキス 5g/L、NaCl 10g/L、グルコース5g/L、寒天15g/L）にて14時間、30℃にて培養した菌体シャーレ1枚分（直径8.5cm）を、グルコース50g/L、硫酸アンモニウム4g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.4g/L、リン酸二水素カリウム2g/L、硫酸第一鉄七水塩10mg/L、硫酸マンガン五水塩10mg/L、酵母エキス4g/L、L-リジン塩酸塩400mg/L、DL-メチオニン400mg/L、DL- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -ジアミノピメリン酸400mg/L、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L及びクロラムフェニコール25mg/Lを含有する培地300mlを注入した1L容のジャーファーメンターに植菌し、34℃及びpH6.0の条件にて培養を開始した。培養pHの制御はアンモニアガスを注入することによって行った。培養開始から約16時間後の培地中のグルコースが枯渇した段階

で培養を終了した。

【0105】

この様にして培養した培養液15mLを、グルコース50g/L、硫酸アンモニウム4g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.4g/L、リン酸二水素カリウム2g/L、硫酸第一鉄七水塩10mg/L、硫酸マンガン五水塩10mg/L、酵母エキス4g/L、L-リジン塩酸塩400mg/L、DL-メチオニン400mg/L、DL- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -ジアミノピメリン酸400mg/L、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L及びクロラムフェニコール25mg/Lを含有する培地15Lを注入した30L容のジャーファーメンターに植菌し、34°C及びpH6.0の条件にて培養を開始した。培養pHの制御はアンモニアガスを注入することによって行った。培養開始から約16時間後の培地中のグルコースが枯渇した段階で培養を終了した

【0106】

この様にして培養した培養液2.8Lを、グルコース50g/L、硫酸アンモニウム5g/L、硫酸マグネシウム七水塩0.4g/L、リン酸二水素カリウム5g/L、硫酸第一鉄七水塩20mg/L、硫酸マンガン五水塩20mg/L、酵母エキス6g/L、L-リジン塩酸塩800mg/L、DL-メチオニン600mg/L、DL- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -ジアミノピメリン酸600mg/L、塩化ナトリウム1.5g/L、塩化カルシウム二水塩0.75g/L、テトラサイクリン塩酸塩25mg/L及びクロラムフェニコール25mg/Lを含有する培地14Lを注入した30L容のジャーファーメンターに添加し、34°C及びpH6.0の条件にて培養を開始した。培養を続けて行くとL-グルタミン酸の蓄積に伴い、pHは自然に低下してゆきpH4.5に至った。この後pH4.5となるようにアンモニアガスを注入することによって培養pHを制御した。また、最初に加えたグルコースが枯渇した後は、700g/Lのグルコースを連続的に添加した。

【0107】

以上のようにしてL-グルタミン酸生産培養を継続し、蓄積したグルタミン酸の濃度が45g/Lに至った時、該培養液に $\alpha$ 型の結晶型を持つグルタミン酸結晶30gを、ジャーファーメンター上部より、結晶を100mLの水に懸濁させた状態で添加し更に培養を継続した。培養液に結晶として蓄積したL-グルタミン酸の濃度と培養液中に溶存するL-グルタミン酸の濃度の総和が100g/Lに達した段階で培養を終了した。ジャーファーメンター内には著量のL-グルタミン酸 $\alpha$ 型結晶が析出した。

この培養液に硫酸を添加する方法を用いてpHをL-グルタミン酸の溶解度が低くなる3.2に調整し、更に冷却により溶液中に溶存するL-グルタミン酸の結晶化を促して晶析スラリー液を得た。この晶析スラリー液中に析出したL-グルタミン酸結晶を、スーパーデカンターを用いて分離することにより、目的とする有機態窒素含有組成物を得た。

## 【0108】

得られた有機態窒素含有組成物の全固形成分に対する各成分の含量分析値を表1に示す。

## 【0109】

## 【表1】

表1 有機態窒素含有組成物分析値

成分	wt% 対 全固形分
全窒素	13.1%
(内) アンモニア態窒素	7.1%
(内) 有機態窒素	6.0%
(内) グルタミン酸の窒素	2.2%
(内) その他の有機態窒素	3.8%
(有機態窒素の全窒素に対する質量%)	46%)
硫酸根	18.9%
(硫酸根の有機態窒素に対する質量%)	315%)

## 【0110】

## 【比較例1】

実施例1において、培地300mlを注入した30L容のジャーファーメンターでの培養の条件を、34°C及びpH6.0にて培養を開始し、この後pH6を維持するようにアンモニアガスを注入することによって培養pHを制御するよう変更した他は、実施例1と同様に培養を行った。得られた培養液から、実施例1と同じ方法により有機

態窒素含有組成物を得た。

【0111】

得られた有機態窒素含有組成物の全固形成分に対する各成分の含量分析値を表2に示す。

【0112】

【表2】

表2 比較対照の有機態窒素含有組成物分析値

wt% 対 全固形分	
全窒素	16.2%
(内) アンモニア態窒素	12.2%
(内) 有機態窒素	4.0%
(内) グルタミン酸の窒素	1.4%
(内) その他の有機態窒素	2.6%
(有機態窒素の全窒素に対する質量%)	25%)
硫酸根	38.2%
(硫酸根の有機態窒素に対する質量%)	955%)

【0113】

表1及び表2の結果から、本発明の有機態窒素含有組成物は、肥料として有効な有機態窒素の含有量が高く、また、有機態窒素の全窒素に対する割合も高く、特にグルタミン酸の窒素以外の有機態窒素含量が高いことが分かる。また、硫酸根の量も低く、本発明の有機態窒素含有組成物は肥料の原料に適していることが分かる。

【0114】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、L-グルタミン酸発酵により、肥料等の原料として適した発酵母液を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 pTWVEK101のエンテロバクター・アグロメランス由来DNA断片の制限酵素地図。

【図2】 エンテロバクター・アグロメランス由来のsucA遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。上段：エンテロバクター・アグロメランス、下段：エシェリヒア・コリ（以下、同様）。

【図3】 エンテロバクター・アグロメランス由来のsucB遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図4】 エンテロバクター・アグロメランス由来のsdhB遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図5】 エンテロバクター・アグロメランス由来のsucC遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、エシェリヒア・コリ由来のものとの比較を示す図。

【図6】 g1tA遺伝子、ppc遺伝子およびgdhA遺伝子を有するプラスミドpMWCPGの構築を示す図。

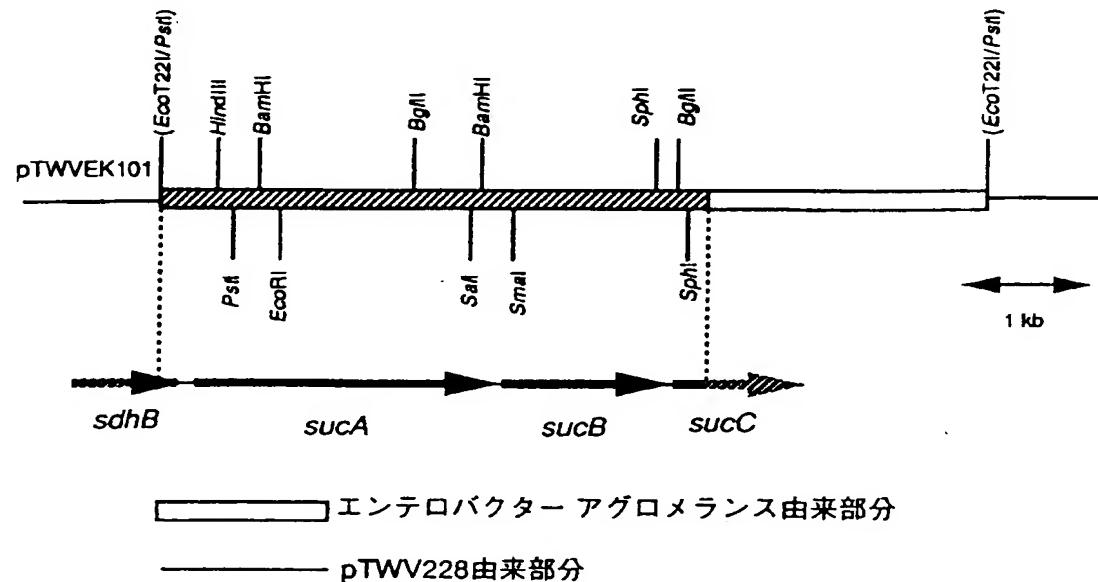
【図7】 広宿主域プラスミドRSF1010の複製起点とテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドRSF-Tetの構築を示す図である。

【図8】 広宿主域プラスミドRSF1010の複製起点、テトラサイクリン耐性遺伝子、g1tA遺伝子、ppc遺伝子およびgdhA遺伝子を有するプラスミドRSFCPGの構築を示す図。

【図9】 g1tA遺伝子を有するプラスミドpSTVCBの構築を示す図

【書類名】図面

【図1】



〔四〕 2

[88.0% / 935 00]

1' MQNSAMKPWLDSWLAGANQSYIEQLYEDFLTDPDSVDAWRSMFQQLPGTVKPEQFHS  
1' MQNSALKWLDSSYLSGANQSWIEQLYEDFLTDPDSVDAWRSFTFQQLPGTVKPDQFHS  
61' ATREYFRRAKDASRYTSSVTDPATNSKQVKVLQLINAFRFRGHQEANLPLGLWKQD  
61' QTREYFRRAKDASRYSSTISDPDTNVKQVKVLQLINAYRFRGHQHANLPLGLWQQDKV  
121' ADLOPAFHDLTDADFQESFNVGSFAIGKETMKLADLFALKQTYCGSIGAEYMHINNT  
121' ADLDPFSFHDLTEADFQETFNVGSFASGKETMKLGELEALKQTYCGPIGAEYMHIT  
181' KRWIQQRIESGASQTSFSGEEKKGFLKELTAAEGL  
181' KRWIQQRIESG--RATFNSEEKKRFLSELTAEEGL  
241' LREMIRHAGKSGTREVVLGMAHRGRLNVLINVLGKKPQDLFDEFSGKHK  
239' LKEMIRHAGNSGTREVVLGMAHRGRLNVLNVLGKKPQDLFDEFG  
301' MGFSSDIETEGGLVHLALAFNPSHLEIVSPVVMGSVRARLDRLAEPVSNK  
299' MGFSSDFQTDGGLVHLALAFNPSHLEIVSPVWIGSVRARLDRLDEPSSNK  
361' AVIGQGVVQETLNMSQARGYEVGGTVRIVINNQVGFTTSNPKDARSTPY  
359' AVTQGVVQETLNMSKARGYEVGGTVRIVINNQVGFTTSNPLDARSTPY  
421' IFHVNADDPEAVFVTRLADYRNTFKRDVFI  
419' IFHVNADDPEAVFVTRLADFRNTFKRDVFI  
481' KHPTPRKIYADRLEGEGVASQEDATE  
479' KHPTPRKIYADKLEQEKV  
541' HEWDEPYPAQVDMKRLKELALRISQVPEQIEVQSRVAKIYNDRKL  
539' HEWDEEYPNKVE  
601' LAYATLVD  
599' LAYATLVD  
661' LSEEAVLAF  
659' LSEEAVLAF  
721' PHGYEGQGPEH  
719' PHGYEGQGPEH  
781' KSLLRHPLA  
779' KSLLRHPLA  
841' DVAIVRIE  
839' DVAIVRIE  
901' LRYAGR  
899' LRYAGR

## 【図3】

[88.2% / 407 aa]

```

1' MSSVDILVPOLPESVADATVATWHKKPGDAVSRDEVIVEIETDKVLEVPASADGVLEAV
1" MSSVDILVPOLPESVADATVATWHKKPGDAVRDEVIVEIETDKVLEVPASADGILDAV

61' LEDEGATVTSRQILGRLKEGNSAGKESAKAESNDTPAQRQTASLEEESDALSPAIRR
61" LEDEGTTVTSRQILGRLREGNSAGKETSAKSEEKASTPAQRQQASLEEQNNDALSPAIRR

121' LIAEHNLDAAQIKGTGVGGLTREDVEKHLANKPQAEEAAAPAAGAATAQQPVANRSEKR
121" LIAEHNLDASAIAKGTGVGGLTREDVEKHLAKAPAKE--SAPAAAAPAAQPALAAARSEKR

181' VPMTRLRKVAERLLEAKNSTAMLTTFNEINMKPIMDLRKQYGEAFERHGVRGLGFMFY
179" VPMTRLRKVAERLLEAKNSTAMLTTFNEVNMKPIMDLRKQYGEAFERHGIRLGFMFY

241' IKAVVEALKRYPEVNASIDGEDOVVYHNYFDVSIAVSTPRGLVTPVLRDVALESMADIEKK
239" VKAVVEALKRYPEVNASIDGDOVVYHNYFDVSIAMVSTPRGLVTPVLRDVALESMADIEKK

301' IKELAVKGRDGKLTVDLTGGNFTITNGGVFGSLMSTPIINPPQSAILGMHAIKDRPMAV
299" IKELAVKGRDGKLTVEDLTGGNFTITNGGVFGSLMSTPIINPPQSAILGMHAIKDRPMAV

361' NGQVILPMMYLALSYDHRLIDGRESVGYLAVKEMLEDPARLLDV
359" NGQVEILPMMYLALSYDHRLIDGRESVGYLAVKEMLEDPTRLLDV

```

## 【図4】

[95.1% / 41 aa]

```

1' MNLHEYQAKQLFARYGMPAPTGYACTTPREAEAAASKIGAG
1" MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEAAASKIGAGPWWVKCQVHAGGRGKAGGV

```

## 【図5】

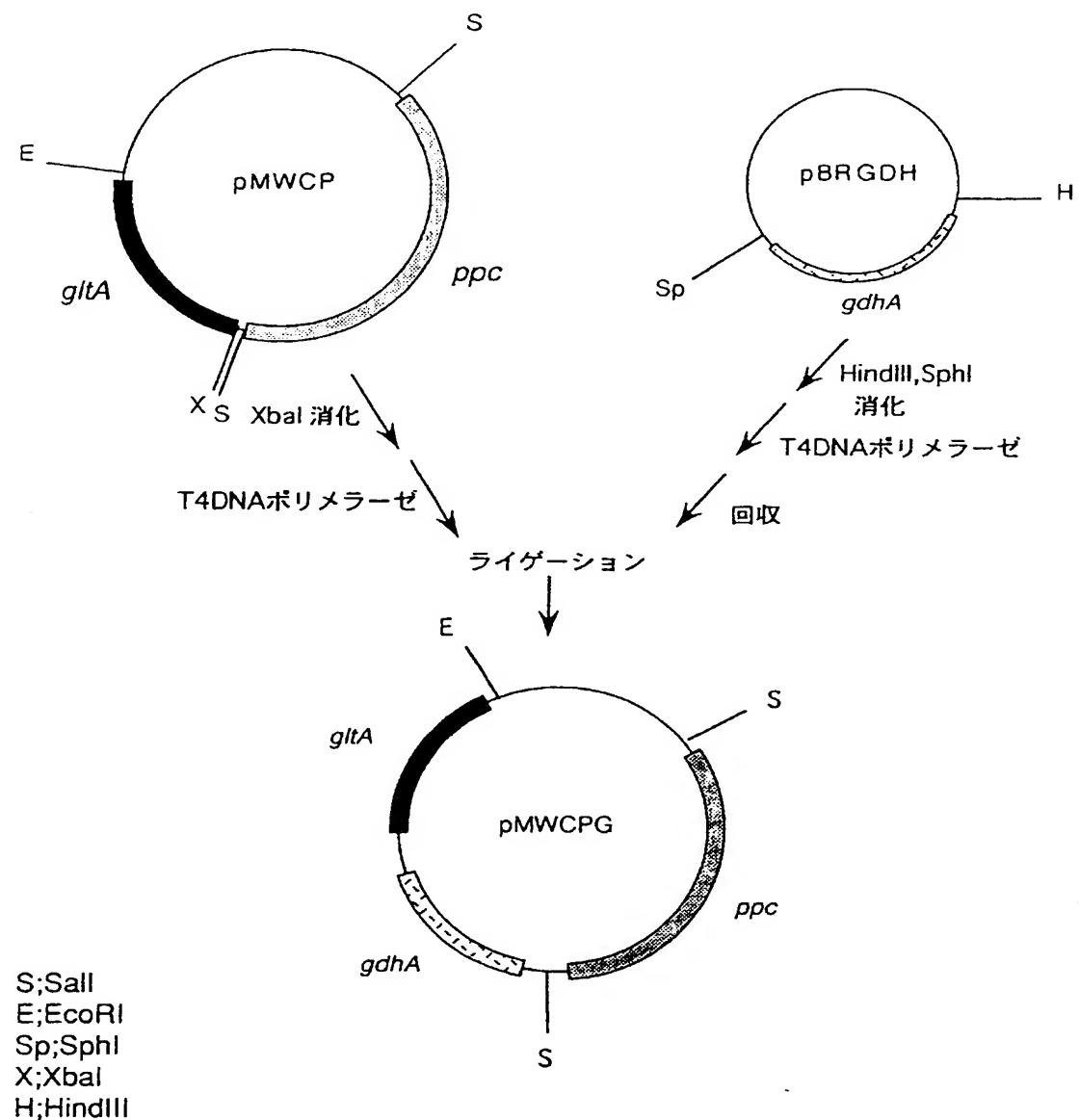
[97.4% / 39 aa]

```

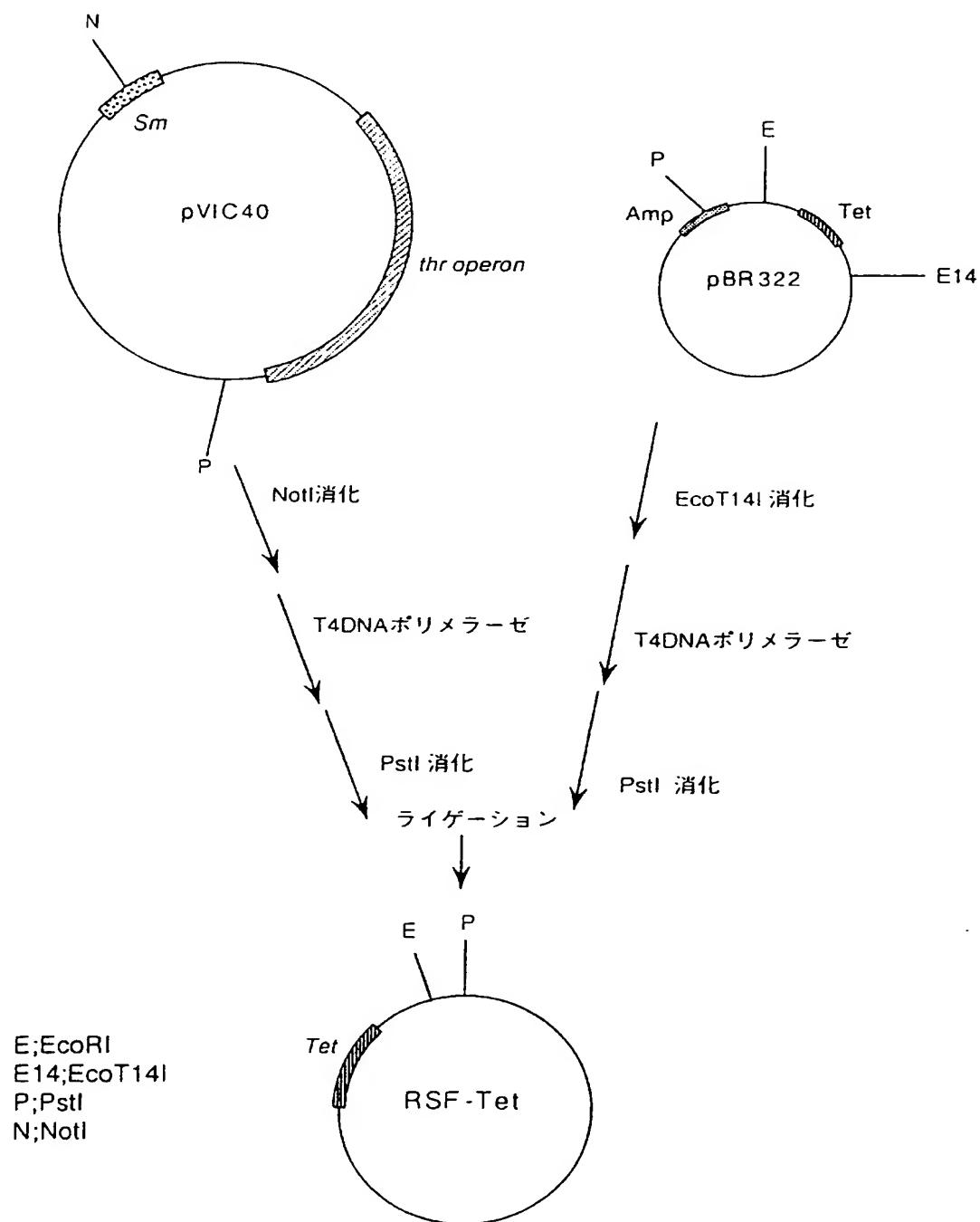
1' AFSVFRCHSIMNCVSVCVKGLNPTRAIGHIKSMLLQRSA
181" FLIDSROTEOTOSRLDGLSOAFSVFRCHSIMNCVSVCVKGLNPTRAIGHIKSMLLQRNA

```

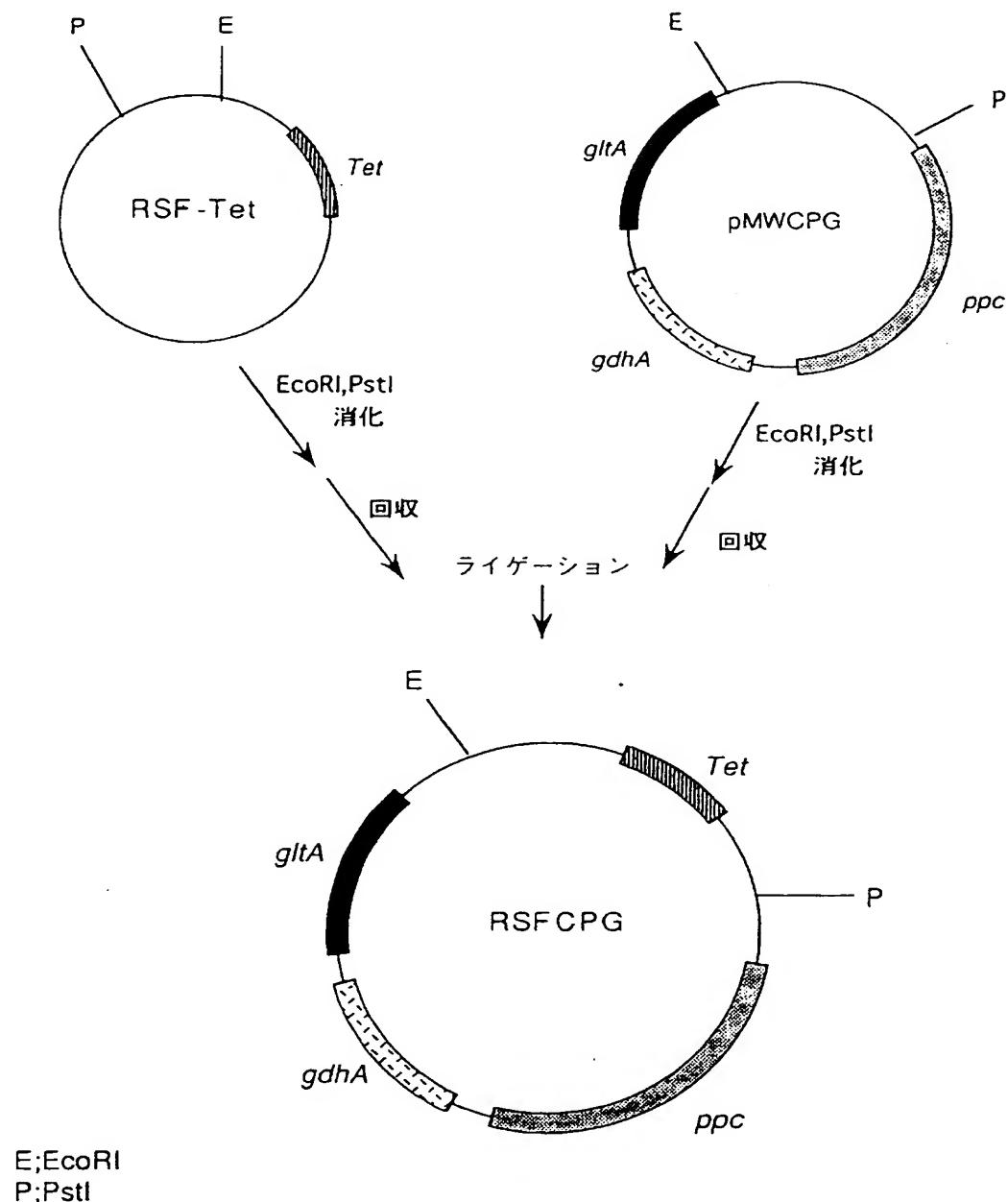
【図6】



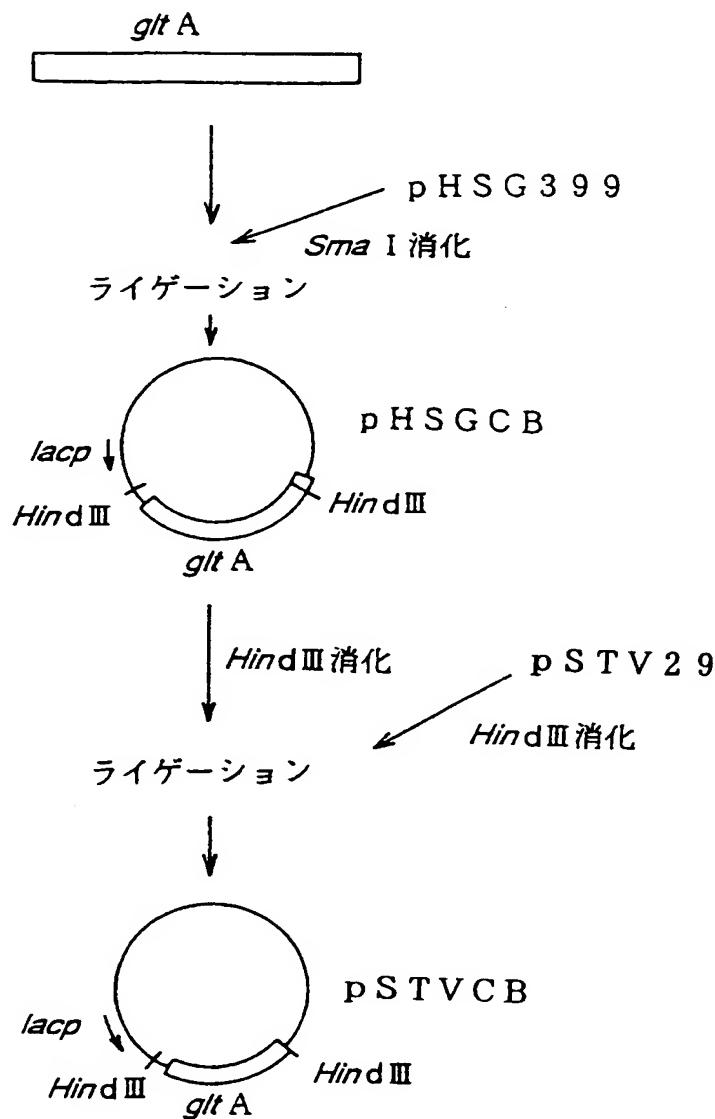
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-グルタミン酸発酵により得られる発酵母液を、 L-グルタミン酸の生産性を低下させることなく、肥料等の原料として用いるのに一層適したものにする。

【解決手段】 L-グルタミン酸を生産する能力を有する微生物を、 pHがL-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地に培養し、該培地中にL-グルタミン酸を析出させながら生成蓄積させ、次いで、該培地からL-グルタミン酸を分離して発酵母液を有機態窒素含有組成物として得る。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社